



УКРАЇНА

(19) UA (11) 76074 (13) C2
(51) МПК (2006)
A61K 31/66
A61K 31/355 (2006.01)
A61K 38/00
A61P 11/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ЛІКУВАЛЬНИЙ ЗАСІБ "КАЛЬМОФІЛ" ДЛЯ ЗАМІЩУВАЛЬНОЇ ТЕРАПІЇ СУРФАКТАНТНОЇ СИСТЕМИ ЛЕГЕНІВ ПРИ ЇЇ РОЗЛАДАХ ТА СПОСІБ ЙОГО ОДЕРЖАННЯ

1

2

(21) а200510611

(22) 09.11.2005

(24) 15.06.2006

(46) 15.06.2006, Бюл. № 6, 2006 р.

(72) Даценко Зоя Михайлівна, Комісаренко Сергій Васильович, Лю Кечун, СН, Белебез'єв Геннадій Іванович, Канівець Наталія Володимирівна

(73) ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМ. О.В. ПАЛЛАДІНА НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ

(56) UA, 20471, А, 15.07.1997

RU, 2198670, С1, 20.02.2003

RU, 2225210, С1, 10.03.2004

(57) 1. Лікувальний засіб для заміщувальної терапії сурфактантної системи легенів при її розладах, який **відрізняється** тим, що він одержаний з морських гідробіонтів та містить біологічно активні речовини у комплексі фосфоліпіди з омега-3 поліненасиченими жирними кислотами (ПНЖК) та плазмалогенні фосфоліпіди: пламенілфосфатидилхолін і плазменілфосфатидилетаноламін, загальний холестерол, жирні кислоти, пептиди, амінокислоти, гепарин, вітамін Е в наступному співвідношенні компонентів, мас. %:

фосфоліпіди	75-85
плазмалогенні фосфоліпіди: плазменілфосфатидилхолін і плазменілфосфатидилетаноламін	0,1-0,5
загальний холестерол	0,2-2,5
	не більше
пептиди	0,5
	не більше
вітамін Е	0,05
гепарин	0,1-0,15
жирні кислоти, амінокислоти	решта.

2. Лікувальний засіб за п.1, який **відрізняється** тим, що одержаний з репродуктивних органів морських гідробіонтів.

3. Лікувальний засіб за п.1 або за п.2, який **відрізняється** тим, що фосфоліпідами з омега-3 ПНЖК є дипальмітоїлфосфатидилхолін з пальмітиновою кислотою та омега-3 ПНЖК в структурі.

4. Спосіб одержання лікувального засобу для заміщувальної терапії сурфактантної системи легенів при її розладах, який **відрізняється** тим, що подрібнюють сировину морських гідробіонтів в замороженому стані, екстрагують сировину етанолом, після чого фільтрують одержаний екстракт від залишків сировини, очистку екстракту здійснюють в суміші органічних розчинників, а після повного видалення органічних розчинників сухий залишок перерозчиняють у гексані з додаванням водного розчину CaCl_2 в етанолі, причому концентрацію CaCl_2 вибирають достатньою для максимального видалення фосфоліпідбілкової фракції, відокремлюють гексановий шар від спиртоводної фракції, додають до гексанової фракції вітамін Е, а після упарювання одержану суміш суспендують у фізіологічному розчині, додають гепарин, а одержані ліпосоми ліофілізують та одержують субстанцію кінцевого продукту.

5. Спосіб за п.4, який **відрізняється** тим, що подрібнюють репродуктивні органи морських гідробіонтів.

6. Спосіб за п.4 або п.5, який **відрізняється** тим, що до гексанової фракції додають вітамін Е в кількості не більше 0,05 % засобу, що одержують.

7. Спосіб за п.4 або п.5 або п.6, який **відрізняється** тим, що після упарювання гексанової фракції одержану суміш суспендують у фізіологічному розчині протягом 30-60 хвилин і додають гепарин при співвідношенні фосфоліпіди: фізіологічний розчин: гепарин = 1:100:(0,1-0,15).

Винахід відноситься до фармацевтичної промисловості, а саме до технології одержання лікарських засобів з тканин морських гідробіонтів і може

бути використаний як лікувальний засіб для відновлення функцій сурфактантної системи людини при її розладах.

(19) UA (11) 76074 (13) C2

Аналіз сучасної інформації вказує, що сурфактант легенів є сумішшю ліпідів та білків, які синтезуються і секретуються в альвеолярній рідині епітеліальними клітинами другого типу, що вистилають легеневі альвеоли та зменшують поверхневий натяг. Головна функція сурфактанту - зниження поверхневого натягу при стані легені-повітря/рідини з утворенням поверхнево-активної плівки, яка містить ліпідний моношар, збагачений дипальмітоїлфосфатидилхоліном (ДПФХ) до (40-50)%. ДПФХ вміщує 2-насичені ацильні ланцюги. Ліпіди з ненасиченими жирними кислотами можуть щільно пакуватись в моношари. Ненасичені ліпіди розглядаються як дуже важливі для функції сурфактанту в зв'язку з тим, що рідинність сурфактантної плівки захищає плівку від жорсткості. До складу поверхнево-активних речовин (ПАР) новонароджених дітей входять такі фракції фосфоліпідів, як ДПФХ, фосфатидилетаноламін (ФЕА), фосфатидилсерин (ФС), фосфатидилгліцерид (ФГ), сфінгомієлін (СМ), фосфатидилінозитол (ФІ), фосфатидна кислота. В складі жирних кислот рідинних фосфоліпідів найбільшу перевагу має пальмітинова кислота.

Оскільки ряд захворювань легенів є наслідком недостатці сурфактанту, основою специфічного проявлення відомих препаратів-сурфактантів як природних, так і штучних є заміщувальна терапія [1].

ДПФХ є єдиним міцним фактором зниження поверхневого натягу, який відповідає за властивості зниження поверхневого натягу легеневого сурфактанту сумісно з іншими фосфоліпідами, а також із сурфактантом апопротеїну (білкові речовини, що підсилюють адсорбцію сурфактанту). Вважається, що фосфатидилхолін (ФХ), ФЕА, ФГ і ФІ вносять значний вклад у підсилення властивостей розповсюдження та адсорбції легеневого сурфактанту.

Відомо, що натуральний легеневий сурфактант включає суміш багатьох сполук, де головним є дипальмітоїлФХ, а саме 1,2-дипальмітоїл,3-гліцероФХ – 41%, холестерол - біля 9%, суміш білків – 9%, ФЕА – 5%. ФГ і ФС – 4%, ФІ – 2%, СМ – 1%, жирні кислоти – 1%. Вказані компоненти можуть бути використані при дихальній недостатності, яка є супутником "респіраторного дистрес-синдрому" (РДС) у дорослих і дітей, який характеризується дефіцитом легеневого сурфактанту при захворюванні "гіалінових мембран" у новонароджених, а також при порушеннях біосинтетичних процесів в альвеолоцитах другого типу, що виробляють сурфактант. Пошкодження сурфактанту може викликатись як гіпоксією, так і гіпероксією, інфекцією дихальних шляхів. Широкий діапазон етіологічних факторів підкреслює актуальність проблеми недостатності сурфактанту, яка може виникнути в будь-якому віці, особливо в реанімаційних хворих при штучній вентиляції легенів [2].

Відомо про замісну терапію для відновлення втраченого сурфактанту тварин. В зв'язку з цим виникає необхідність одержання штучних аналогів сурфактанту на основі підбору компонентів, які подібні за складом речовинам природного сурфактанту. Показано позитивний вплив екзогенних сурфактантів із легенів корови [3] і амніотичної ріди-

ни [4], які вводили дітям з дихальним синдромом. При цьому не було виявлено побічних токсичних ефектів.

З встановленням факту, що штучний сурфактант зменшує тяжкість захворювання дихальних розладів і попереджує захворювання, проводиться пошук і створення синтетичних сурфактантоподібних засобів для лікування синдрому РДС. Для отримання швидкого зниження поверхневого натягу легенів можливе використання ліпідної суміші, подібної легеневого сурфактанту *in vivo*, яка складається з гетерогенної суміші ліпідів, що включає ДПФХ та інші фосфоліпіди з більш низькою температурою плавлення. В зв'язку з цим є актуальним і необхідним пошук фосфоліпідних сумішей природного походження, які були б близькі за своїм складом до сурфактанту і могли б використовуватися для лікування людини з недостатністю сурфактанту.

Відомо одержання штучного сурфактанту на основі ДПФХ або фосфоліпідної суміші в різних концентраціях, до складу яких входять такі компоненти, як цукри, амінокислоти, спирти та жирні кислоти [5]. При клінічних і фармакологічних випробуваннях не всі штучні сурфактанти виявляють високу ефективність.

Відомо декілька синтетичних сурфактантів ("Ecxoswf" - США [6], "Aiek" - Велика Британія), напівсинтетичні ("Survanta" - ROSS - США), природні ("Куросурф" - США) [7].

Відомий патент, де представлено застосування сумішей фосфоліпідів і нейтральних ліпідів як заміщувальної сурфактантної терапії різних форм РДС. Ці суміші показали значне підвищення поверхнево-активних ліпідів при використанні штучного сурфактанту [8].

Відомо про компонент, що забезпечує активність композицій - аналогів препаратів для заміщувальної сурфактантної терапії легеневих захворювань на основі гідрованого соєвого ФХ (фосфоліпон-90Н) як активного компоненту [9], що забезпечує поверхнево-активні властивості препарату для заміщувальної сурфактантної терапії.

Відомо про вплив короткострокового ентерального вживання омега-3 ліпідів на жирнокислотний склад легенів макрофагів і сурфактантні фосфоліпіди, що підтверджує швидко модифікацію мембранних фосфоліпідів і поліненасичених жирних кислот (ЖК) [10].

На даний час є важливі дослідження, які вказують, що дефіцит есенціальних ЖК та фосфоліпідів впливає на розвиток різних захворювань і, в тому числі, свідчать про проявлення клініки захворювання легенів і недостатності сурфактанту. Це може бути пов'язано з відсутністю в організмі хворих полі ненасичених ЖК та есенціальних фосфоліпідів [11].

Існує гіпотеза, що низький рівень легеневих захворювань ескімосів є наслідком особливості харчування, в якому виявлено значний вміст ПНЖК ω -3 та ω -6.

Імовірно, що ПНЖК переводять продукцію ейкозаноїдів на інший шлях синтезу від арахідонової кислоти. Таким чином, відбувається зменшення продукції бронхоспастичних лейкотриєнів. Дослідження на тваринах показали, що додавання ей-

козапентаєнної (ЕПК) або гама-ліноленової кислоти тваринам, які були під дією ендотоксинів, приводить до зменшення дії останніх на тромбосан В-2 і підвищує стійкість легеневої судин [12]. Є деякі відомості про те, що додавання ЕПК приводить до збільшення її вмісту у складі фосфоліпідів та до зменшення утворення лейкотриєнів у нейтрофілах. У зв'язку з цим захисний вплив ПНЖК при легеневої хворобах біологічно ймовірний. Результати епідеміологічних випробувань показали можливість захисних ефектів ПНЖК проти астми у дітей і позитивні результати їх дії на бронхіти. Також показано, що споживання морських риб може захистити від епідемій та хронічних бронхітів. В останні роки омега-3 ПНЖК у вільному вигляді або в складі риб'ячого жиру використовуються для лікування деяких хвороб. Але відомо, що вільні омега-3 ПНЖК як нестабільні речовини можуть окислюватися в препаратах і в організмі при недостатності антиоксидантів. В той же час в складі фосфоліпідів ПНЖК проявляють стабільну резистентність до окислювальної деградації [13]. Крім цього відомо, що омега-3 ПНЖК в дієті швидко включаються в мембрани фосфоліпідів альвеолярних макрофагів, легенів і сурфактанту. Було також показано, що фосфоліпіди з омега-3 ПНЖК більш активно включаються в мембрани клітин ніж вільні ЖК - ЕПК і ДГК. При цьому омега-3 ПНЖК специфічно збільшуються в мембранних фосфоліпідах і не конкурують із зменшенням рівня арахідонової кислоти, яка є найбільш важливою омега-6 у складі ЖК фосфоліпідів у біологічних мембранах у порівнянні з ейкозапентаєнною кислотою.

В основу винаходу поставлено розробку способу одержання лікувального засобу для відновлення сурфактантної системи легень при її розладах шляхом застосування нового способу обробки репродуктивних органів із морських гідробіонтів для одержання природного поверхнево-активного лікарського засобу на основі комплексу фосфоліпідів із омега-3 ПНЖК у структурі, що включають плазмалогенні фосфоліпіди, регуляторні коротколанцюгові пептиди та амінокислоти, якому притаманні поверхнево-активні властивості сурфактанту і який, таким чином, виявляє позитивні властивості

у якості заміщувальної терапії при розладах системи сурфактанту. Одержаний засіб забезпечує підвищення поверхневої активності та зменшення антигенних властивостей.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб одержання лікувального засобу (торговельна марка - "Кальмофил") для відновлення порушень сурфактантної системи людини, включає подрібнення сировини репродуктивних органів морських гідробіонтів (молочко, ікра головоногих моллюсків - кальмарів та морських риб) у замороженому стані, екстракцію сировини етанолом, відокремлення етанольного екстракту від залишків сировини фільтрацією, упарювання етанольного екстракту до остаточного видалення етанолу, очищення одержаної фракції від похідних вуглеводнів, ефірів ЖК, продуктів окислення холестеролу та його ефірів перерозчиненням ліпід-білкової фракції в гексані, додаванням до гексанової фракції (5-15)%-го водного розчину 10мМ CaCl₂ в етанолі у співвідношенні 1:5 та 1:10, відокремлення гексанового шару від спиртово-водної фракції, додавання до гексанової фракції вітаміну Е до концентрації не менше 0,05% і після упарювання гексанової фракції одержані ліпіди суспендують протягом 30-60 хвилин в фізіологічному розчині, додають гепарин у співвідношенні ПАР-фізіологічний розчин:гепарин = 1:100:(0,1-0,115), а отримані ліпосоми ліофілізують та одержують субстанцію кінцевого продукту.

До складу ПАР з гонад кальмарів входять: фосфоліпіди-(75-85)% серед яких основний - ФХ, що вміщує до (27-35)% пальмітинової кислоти, (16-17)% ейкозапентаєнної кислоти, (17-18)% докозагексаєнної кислоти, в тому числі плазмалогенні фосфоліпіди (плазменілфосфатидилхолін і плазменілфосфатидилетаноламін), які ефективно зменшують поверхневий натяг [14], загальний холестерол (0,5-2,5)%, жирних кислот (0,1-0,5)%, вуглеводи (0,1-0,5)%, в том числі вільні ЖК (0,1-2,8)%, амінокислоти (5-7мг/мл), вітамін Е не більше 0,05 %, гепарин (0,1-0,15)% [2].

При дослідженні складу компонентів сурфактанту - поверхнево-активних речовин (ПАР) з морських організмів виявлена їх подібність до складу ПАР, вилучених з тканин легень (таблиця 1, 2).

Таблиця 1

Якісний та кількісний склад компонентів ПАР

Компоненти ПАР з морських організмів, що мають властивості сурфактанту		Компоненти ПАР з легеневої тканини тварин	
Назва компоненту	Вміст, %	Назва компоненту	Вміст, %
Фосфоліпіди	75-85	Фосфоліпіди	68,6-90,7
Загальний холестерин	0,2-2,5	Загальний холестерин	0-8,0
Вільні жирні кислоти	0,1-2,8	Вільні жирні кислоти	1,0-27,7
Похідні вуглеводнів	0,1-0,3	Вуглеводні	0,1-2,0
Пептиди, не більше	0,5	Білок	1,0-3,0
Фосфатидилхолін	72-87	Фосфатидилхолін	58,4-85,0
Фосфатидилетаноламін	7,0-12,8	Фосфатидилетаноламін	2,6-3,5
Сфінгомієлін	5,7-9,0	Сфінгомієлін	3,2-12,0
Фосфатидилгліцерид	0,4-8,0	Фосфатидилгліцерид	0,1-12,0
Фосфатидилінозитол	1,5-2,2	Фосфатидилінозитол	1,2-6,6
Фосфатидилсерин	0,6-1,2	Фосфатидилсерин	1,0-6,4
Плазмалогени (плазменілфосфатидилетаноламін, плазменілфосфатидилхолін)	0,1-0,5	Вуглеводи	
Вуглеводи	0,1-0,5		
Гепарин (ПАР: фізіологічний розчин:гепарин)	1:100:(0,1-0,15)		
Вітамін Е, не більше	0,05		

Характеристика "сурфактанту", отриманого з гонад кальмару

Досліджувані фракції	Вміст неорганічного фосфору, мкг/мл	Вміст азоту, мкг/мл	Вміст загальних ліпідів, мг/мл	Вміст амінокислот у гідролізаті, мкг/мл
ПАР фосфоліпідів /сурфактант/	300-400	140-160	3,5-5,0	5-7

Сукупність визначених авторами операцій способу, його режимів застосування схем і обробки репродуктивних тканин морських головоногих моллюсків (кальмарів) дозволяє одержати засіб з новим спектром властивостей та вирішити поставлену задачу. Застосування операцій способу призводить до наступних переваг:

- використання відходів рибної промисловості як сировини;

- використання репродуктивних органів морських головоногих - моллюсків (кальмарів) дозволяє одержати значний вміст фосфоліпідів з омега-3 ПНЖК, серед яких головним є ДПФХ з пальмітиновою кислотою та омега-3 ПНЖК в структурі, а також плазмалогенних фосфоліпідів (плазменілФЕА і плазменілФХ), цінних амінокислот, включаючи значний вміст аргініну, гліцину, а також глютамінової кислоти, які мають відношення до коротколанцюгових пептидів та пептидних біорегуляторів, які підвищують сурфактантоподібні властивості засобу;

- за рахунок маніпуляції з перерозчиненням екстракту в гексані з додаванням водного розчину 10ММ CaCl_2 в етанолі вдається видалити значну кількість ефірів холестеролу, жирних кислот та вуглеводнів, що покращує якість субстанції;

- перевага нового способу полягає в тому, що одержана субстанція містить комплекс фосфоліпідів з омега-3 ПНЖК, серед яких основний ДПФХ містить до (35-50)% пальмітинової кислоти, до 20% докозагексаєнової кислоти, (10-15)% ЕПК, причому всі фосфоліпіди одержаного комплексу вміщують пальмітинову кислоту;

- одержана субстанція містить регуляторні пептиди, амінокислоти, незначну кількість білку, в зв'язку з чим одержаний препарат не має побічної дії і не проявляє антигенних властивостей по відношенню до місцевих клітинних імунних реакцій в легенях про що свідчать експериментальні дослідження інгаляційного введення препарату щурам з подальшим гістохімічним вивченням макрофагів. Число макрофагів при дії сурфактанту протягом 1 години та 1, 3, 7 діб не відрізняється від контролю. Наведені дані про відсутність антигенності препарату можуть бути обумовлені присутністю тільки невеликої домішки білку (0,1-0,5)% в препараті, що є позитивним фактором.

Використання вказаного способу має такі переваги:

- значний вихід (до 8 %) біологічних ПАР із відходів морських організмів (репродуктивних органів кальмарів) у порівнянні з ПАР із легеневої тканини ссавців (до 1,5%);

- покращення якості очистки за рахунок перерозчинення біологічних ПАР в гексані з додаванням спиртового розчину CaCl_2 ;

- проведення операції суспендування ліпідних компонентів для одержання ліпосом;

- додавання до суміші ПАР гепарину, який покращує мікроциркуляцію кровообігу та стабілізує низькодисперсну структуру ліпосомного препарату;

- наявність у фракції фосфоліпідів значної кількості плазмалогенів пояснює підвищення поверхневої активності сурфактантом з морських організмів;

- спрощення способу одержання препарату;

- одержана субстанція за рахунок фосфоліпідів з омега-3 ПНЖК в структурі має мембранно-протекторні та імунно-модуючі властивості, відновлює недостатність ПНЖК в організмі - докозагексаєнової і ейкозапентаєнової та регулює вміст арахідонової кислоти, яка має відношення до синтезу простагландинів в організмі.

Короткострокове збагачення організму препаратом з фосфоліпідами омега-3 ПНЖК надає швидку модуляцію мембранних фосфоліпідів легеневої тканини, альвеолярних макрофагів, легеневого сурфактанту.

Основою створеного комплексу є фосфоліпіди, серед яких головний є ДПФХ з омега-3 ПНЖК в структурі, плазмалогенні фосфоліпіди - плазменілФХ і плазменілФЕА із значною кількістю докозагексаєнової кислоти в структурі, які ефективно зменшують поверхневий натяг і стабілізують гексагональну структуру ФЛ та покращують поверхневу активність сурфактантоподібної фосфоліпідної суміші [14]. До цього комплексу входять також вільні амінокислоти із значним вмістом лізину, аргініну, гліцину, глютамінової кислоти, які є біологічно активними речовинами, вітамін Е і гепарин.

Усунення новим способом одночасно значної кількості небажаних ліпідів у комплексі з білком дозволяє виділити субстанцію, яка за складом біологічно активних речовин має відношення до відновлення порушень функції сурфактантної системи організму і лікування легеневої захворювань, недостатності сурфактанту в організмі, хвороби гіалінових мембран новонароджених.

Суть винаходу полягає в тому, що для заміщувальної терапії легеневої захворювань та при недостатності сурфактанту особливо у новонароджених вперше виділена субстанція біологічно активних речовин з морських організмів (фосфоліпіди з омега-3 ПНЖК в структурі - сурфактантоподібний комплекс), яка використовується для заміщувальної терапії легеневої захворювань, що ілюструється конкретними прикладами його здійснення та результатами дослідження одержаного кінцевого продукту - субстанції препарату.

Приклад 1

100г гонад кальмарів (молочко і ікра) подрібнюють в замороженому стані на м'ясорубці, заливають 10 об'ємами етанолу, перемішують 3 години в реакторі з мішалкою, далі екстракт фільтрують, випаровують у вакуумі до повного видалення спирту. Одержану фракцію перерозчиняють в гек-

сані у співвідношенні 1:5 при температурі (25-30)°C. У гексановий розчин додають 5%-й водний розчин 10мМ CaCl₂ в етанолі. Осад, що містить домішки білків і нейтральних ліпідів, після відстоювання відокремлюють, а в гексановий розчин додають вітамін Е у кількості не менше 0,05%, випарюють у вакуумі та одержують ліпідну фракцію, яку суспендують протягом 30 хвилин у фізіологічному розчині, додають гепарин у кількості 0,1%, ліофілізують і отримують субстанцію, яку використовують для одержання лікарської форми препарату. Вихід - 8г (8%).

Приклад 2

100г ікри кальмарів подрібнюють в замороженому стані на м'ясорубці, заливають 10 об'ємами етанолу, перемішують 3 години в реакторі з мішалкою, далі екстракт фільтрують, випарюють у вакуумі до повного видалення спирту. Одержану фракцію перерозчинюють в гексані у співвідношенні 1:10 при температурі (25-30)°C. У гексановий розчин додають 10%-й водний розчин 10мМ CaCl₂ в етанолі. Осад, що містить домішки білків і нейтральних ліпідів, після відстоювання відокремлюють, а в гексановий розчин додають вітамін Е у кількості не менш 0,05%, випарюють у вакуумі та одержують ліпідну фракцію, яку суспендують протягом 30 хвилин у фізіологічному розчині, додають гепарин у кількості 0,15%, ліофілізують і отримують субстанцію, яку використовують для одержання лікарської форми препарату. Вихід - 7,5г (7,5%).

Приклад 3

100г молочка кальмарів подрібнюють у замороженому стані на м'ясорубці, заливають 10 об'ємами етанолу, перемішують 3 години в реакторі з мішалкою, далі екстракт фільтрують, випарюють у вакуумі до повного видалення спирту. Одержану фракцію перерозчинюють в гексані у співвідношенні 1:5 при температурі (25-30)°C. У розчин гексану додають (5-15)%-й водний розчин 10мМ CaCl₂ в етанолі. Осад, що містить домішки білків і нейтральних ліпідів, після відстоювання відокремлюють, а в розчин гексану додають вітамін Е у кількості не менш 0,05% і випарюють у вакуумі. Одержану ліпідну фракцію суспендують протягом 30 хвилин у фізіологічному розчині, додають гепарин у кількості 0,15% для покращення мікроциркуляції кровообігу, одержаний розчин ліофілізують і отримують субстанцію, яку використовують для

одержання лікарської форми препарату. Вихід - 7,0г (7%).

Приклад 4

Дослідження дії фосfolіпідного препарату з морських організмів як сурфактанту.

Проведення випробувань відбувалось в наступних напрямках:

- модулювання процесів інтоксикації, що призводить до порушень властивостей сурфактантної системи легенів і завершується літальним кінцем без застосування спеціальної терапії;

- застосування речовини із властивостями сурфактанту шляхом інгаляційної дії на експериментальних тваринах;

- спостереження за станом тварин (кількість загиблених, показники стану сурфактантної системи легенів);

- розробка рекомендацій по застосуванню препарату, одержаного з відходів переробки кальмарів (гонади) для аерогенного впливу в умовах інтоксикації.

При проведенні досліду вимірюють наступні показники: загинь тварин, зміни маси тіла, зниження величини поверхневого натягу сурфактанту легенів (сталагмометрично), кількість альвеолярних макрофагів в трахеобронхіальному лаваші, клітинна реакція сурфактантної системи легенів, стан функції легенів за показниками об'єму піни, часу випарювання.

В дослідах для інгаляційного впливу використовують білих щурів на звичайному раціоні. Час спостереження за тваринами -14 діб з моменту модулювання токсичного процесу. Речовина з властивостями сурфактанту застосовується для інгаляції в 1% - та 10%-му розчині на етанолі. Кількість речовини для інгаляції не перевищує 0,25мл/хв. Розмір часток, що інгалюються, складає від 0,03 до 3,0мкм. В контрольних експериментах встановлена відсутність інгаляційного впливу на поведінку та на тривалість життя щурів з масою тіла від 185,0 до 210,0г.

В результаті застосування речовини з властивостями сурфактанту при максимальних ознаках інтоксикації без застосування інших спеціальних методів антидотної терапії виживання щурів в досліджуваних групах зросло відповідно - при мепротановій, аміачній і бензиновій інтоксикаціях на 40, 35 і 50 % (табл. 3).

Таблиця 3

Поверхнево - активні властивості легенів експериментальних тварин

Інтоксикація	ICT 50*		ICT50 + речовина з властивостями сурфактанту в інгаляції		ICT 50 + антифомсилан	
	Макро фаги, 1×10 ⁻³ , мл	ПН**, 1×10 ⁻³ , н/м	ПН, 1×10 ⁻³ , н/м	Макро фаги, 1×10 ⁻³ , мл	ПН, 1×10 ⁻³ , н/м	Макро фаги, 1×10 ⁻³ , мл
Мепротан	7,8±1,7	54,9±0,7	14,7±2,5	42,2±2,7	9,3±0,7	47,3±1,6
Аміак	6,4±0,9	51,3±1,6	13,8±0,6	42,0±0,9	10,9±0,5	48,1±2,0
Бензин	8,2±1,02	49,9±0,5	15,8±0,3	47,6±0,8	14,3±1,2	48,2±0,9
Контроль без дії ФАР***	15,2±0,66	40,1±0,3	-	-	-	-

* - ICT - інгаляційна доза токсичності;

** - ПН - поверхневий натяг;

*** - ФАР - фізіологічно активна речовина.

Токсикологічну оцінку нового препарату - штучного сурфактанту з гонад кальмару - вивчали шляхом інгаляційного введення за допомогою

приладу ПАІ-2 білим щурам (вагою тіла 195,6±4,5г) та білим мишам (вагою тіла 23,4±1,7г) протягом 7 діб в інтервалах 1 година, 1, 3, 7 діб. В кожну з 4

груп брали по 10 тварин. Масові концентрації аерозолі препарату в межах від 33333,0 мг/м³ до 666 мг/м³ підтримують протягом 4 годин інгаляційного впливу для щурів і 2 години для мишей. До інгаляції і після неї тварини знаходяться в умовах звичайного лабораторного утримання. Клінічні дослідження за станом тварин і розподілом загибелі тварин проводять протягом 14 діб з моменту інгаляційного

впливу препарату. Встановлено, що для білих щурів середня летальна концентрація складає 11200,0±606,4 мг/м³, а для білих мишей 8000±542,0 мг/м³. У відповідності з вимогами ДЕСТ 12.1.007-76 препарат відноситься до 3 класу небезпечності при інгаляційному впливі і є сполукою з помірно небезпечними властивостями (табл. 4).

Таблиця 4

Токсикологічна характеристика дії сурфактанту з гонад кальмару

Шляхи введення	Тип тварин	Вміст сурфактанту з гонад кальмару	Клас небезпечності
ЛД50	Миші	3300±36,6 мг/кг	Повільно небезпечний
Дигестивне введення	Щури	4800±127,5 мг/кг	-
ЛД50	Миші	Більше 2500 мг/кг	Мало небезпечний
Аплікація на шкірі	Щури	Більше 2500 мг/кг	-
ЛД50	Миші	14700±433,6 мг/кг	Повільно небезпечний
Інгаляція	Щури	32500±2333,3 мг/м ³	-

3 клас небезпечності за ДЕСТ 12.1.007-76

Фармакологічну оцінку сурфактанту, отриманого з гонад кальмару, проводять в умовах його інгаляційного введення. Концентрація препарату, який вводиться аерозольно, була кратна одній десятій середньолетальної дози для білих щурів вагою тіла 195,6±4,5г. Дослід проводять в динаміці (1 година, 1, 3, 7 діб). В групи брали по 10 тварин. Концентрація аерозолі препарату

(1120,0±254,3 мг/м³) підтримується в камері протягом 4 годин інгаляційного впливу.

В умовах описаного дослідження загибелі піддослідних тварин не зареєстровано. Як після інгаляції, так і протягом спостереження тварини відчували себе задовільно. Аерозольний вплив не приводить до наявних розладів з боку органів та систем (табл. 5).

Таблиця 5

Стан кондиціонерної та гідродинамікорегуляторної функції

Показники стану	Контроль	Мепротан	Аміак	Бензин
Об'єм піни, см ³	1,32±0,09	5,9±0,6	24,7±1,5	32,4±0,8
При інгаляції сурфактанту	1,09±0,08	2,3±0,8	5,3±0,8	6,9±0,9
Час випарення сурфактанту, мл/хв	0,0090±0,0001	0,030±0,001	0,050±0,002	0,020±0,001
При інгаляції речовини, яка має властивості сурфактанту	0,0080±0,0001	0,0070±0,0001	0,010±0,002	0,0090±0,0002

Досліди з перевірки препарату "Кальмофіл" на поверхневий натяг та сурфактантну дію проведені американськими дослідниками Університету (Каліфорнія, Лос-Анжелес) з препаратами - стандартами для замісної сурфактантної терапії "Survanta" та "Exosurf США". Показано близьку активність "Кальмофілу" до вказаних стандартів. При застосуванні препарату "Кальмофіл" порівняно з контролем підвищується виживання тварин. В досліді in vivo та in vitro при токсичній дії окислювального стресу, індукованого гострим отруєнням CCl₄, вве-

дення препарату знижує токсичну дію метаболічної отрути, позитивно впливає на виживання тварин, знижує інтенсивність перекисного окислення ліпідів (ПОЛ), корегує токсичний вплив CCl₄. Дослідження in vivo властивостей сурфактанту на недоношених кроликах з недостатністю сурфактанту, проведені в порівнянні з препаратами-стандартами "Survanta" та "Exosurf", показали зниження рівня респіраторного тиску легенів (табл. 6).

Таблиця 6

Специфічна дія лікувального засобу "Кальмофіл"

Препарат	Параметри вимірювання			
	Поверхневий натяг, (дин/см)	Виживання тварин при інтоксикації. Захисний індекс (одиниці)	Активність (АО*, ПОЛ, СОД**), %	Пік респіраторного тиску легенів
"Кальмофіл"	Мін. - 11,7 Макс. - 48,5	1,5-2,0	In vivo: ПОЛ-153 СОД-72 in vitro: АО-50	24,9±1,1
Сурфактант тварин	Мін. - 10,3 Макс. - 42,3	-	-	-
CCl ₄	-	-	In vivo: 265	-
СОД	-	-	In vivo: 46	-
Препарат-стандарт "Survanta"	Мін. - 4,1 Макс. - 37,5	-	-	21,2±1,1
Препарат-стандарт "Exosurf"	Мін. - 21,0 Макс. - 67,5	-	-	21,2±1,1

Вітамін Е	-	-	АО - 53	-
Фосфоліпідна фракція тканин легенів	-	-	АО - 17	-

* - АО - антиоксидантна активність

** - СОД - супероксиддисмутазна активність

Досліджуваний препарат ПАР є інтактним відносно функціональної активності та морфології макрофагів легенів. Він не виявляє антигенних властивостей відносно місцевих клітинних імунних реакцій в легенях, про що свідчить структурна та функціональна стабільність легеневих макрофагів та експериментальні досліді з інгаляційного введення препарату щурам при послідовному гістохімічному вивченні макрофагальної функції. Число макрофагів при дії сурфактанту протягом інтервалів часу 1 година, 1, 3, 7 діб не відрізнялись від контрольних. Одержані дані про відсутність антигенності препарату можуть бути обумовлені присутністю лише незначної домішки білку (0,1-0,5%) в препараті, що є позитивним фактором.

При використанні наведеного способу досягаються наступні переваги:

- підвищується вихід ПАР з гонад кальмару - основи штучного сурфактанту (до 8%) в порівнянні з ПАР, одержаних з тканин легенів телят (до 1,0%) [3];

- спрощується спосіб одержання цільового продукту;

- ефективно зменшується поверхневий натяг при наявності плазмалогенів (плазменілФЕА і плазменілФХ), що діють як антиоксиданти проти ліпідної пероксидації, а також як антиоксиданти ліпопротеїнів низької щільності;

- вітамін Е захищає як ліпідні компоненти, так і білки сурфактанту легенів від окисдактивного окислення;

- покращується мікроциркуляція кровообігу з додаванням гепарину;

- покращуються властивості сурфактанту при інгаляційному застосуванні завдяки додаванню іонів Ca^{2+} на стадії очистки препарату, що сприяє кращій адсорбції сурфактанту поверхністю легень і розправленню впадих альвеол.

При інгаляційному введенні препарату ПАР з гонад морських організмів, одержаного за новим способом, досягається наступний ефект:

- підвищується поверхнева активність легенів у тварин за рахунок зниження поверхневого натягу до нормальних показників (48,5 та 11,7дин/см);

- практично не змінюється в порівнянні з контролем кількість альвеолярних макрофагів протягом досліджуваного періоду ($6,5-6,9 \cdot 10^{-3}$ макрофагів в мл).

Одержані результати свідчать про доцільність винаходу для подальшого застосування в практиці лікування хворих. Одержаний лікувальний засіб "Кальмофіл" доцільно використовувати в ургентній токсикологічній практиці при порушенні функцій

сурфактантної системи легенів. Одноразове застосування сурфактантоподібної речовини з морських організмів не виявляє відхилень у нормальних тварин, а в умовах інтоксикації сприяє нормалізації порушень функції легенів: знижує інтенсивність процесів ціноутворення, нормалізує клітинну реакцію сурфактанту легенів і певним чином полегшує протікання токсичного процесу.

Таким чином, запропонований винахід вирішує задачу одержання з гонад морських організмів лікувального засобу "Кальмофіл", до складу якого входять фосфоліпіди з омега-3 ПНЖК, плазмалогенні фосфоліпіди, регуляторні пептиди, амінокислоти, вітамін Е та гепарин. Створений комплекс біологічно активних речовин має адаптогенні та антиоксидантні властивості. Одержаний запропонованим способом лікарський засіб "Кальмофіл" може бути застосований для відновлення функції сурфактантної системи легенів людини при її розладах шляхом заміщувальної терапії.

СПИСОК ПОСИЛАНЬ:

1. USA 5032585 Jul.16, 1991.
2. Березовский В.А. Возможности коррекции состояния сурфактантной системы. Врачебное дело, 1984, № 41, с. 107-111.
3. RU 2198670 Cl 20.02.2003.
4. RU 2066197 Cl 10.09.1996.
5. EP 0286011A2 12.16.88.
6. USA 5110866 1992.
7. Гребенников В.А. Респираторный дистресс-синдром у новорожденных. М., 1995.
8. DE 2900300 (Keitzing LV). JP 58222022 (Teijin K). EP 110498. USA 4312860.
9. RU 2213746 Cl 10.10.2003.
10. Palombo JD, Lydon E-E, Chen - PI et al. Fatty acid composition of lung, macrophage and surfactant phospholipids after short-term enteral feeding with n-3 lipids. - Lipids. - 1994. - 29,9. - p. 643 - 649.
11. Carrie I, Clement M, de Javel D at al. Phospholipid supplementation reverses behavioral and biochemical alterations induced by n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency in mice. J Lipid Res 2000 Mar,41(3):473-480.
12. Lessons from the story of n-3 fatty acids. N-3 fatty acids. Role of polyunsaturated fatty acids in lung disease. Am. J. Clin. Nutr. 2000, 71, (1S):1S-398S.
13. Song J.H., Jhoul Y., Miyazawa T., Biosci. Biotechnol. Biochem. 1997,01, № 12.
14. M.Rudiger, Kolleck, Puiz at al. Plasmalogens effectively reduce the surface tension of surfactant like phospholipid mixtures. Amer. J. Physiol., 1998, v.274, 1, L.143-148.